

## 明細書

## 脈管病に関する光物理化学的・診断方法

## 5 技術分野

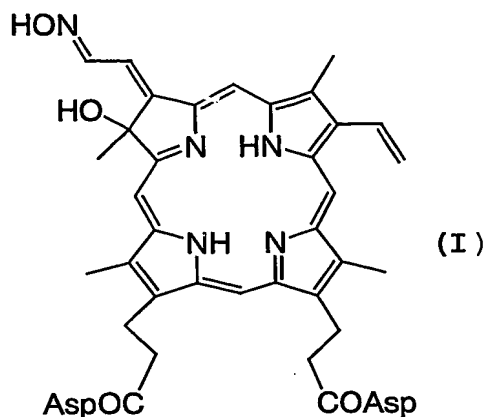
本発明は、イミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、脈管病に関する光物理化学的診断・治療法（PDT: Photodynamic Therapy）用のリユーマチ治療薬、炎症性角化症治療薬、ならびにセンチネルリンパ節（sentinel lymph node : 以下SNという）の存在部位確認および癌転移診断薬に関する。

## 背景技術

癌の新しい治療法として、光物理化学的診断・治療法（PDT: Photodynamic Therapy）が行われている。これはある種のポルフィリン誘導体を静脈内注射などの方法により投与して、癌（腫瘍）組織に選択的に集積させた後、レーザー光を照射することにより癌組織のみを選択的に破壊する治療法であり、ポルフィリン誘導体が有する癌組織への選択的集積性と、光増感作用という2つの特性を利用した治療法である。

本発明者らは、このPDTに使用することができるポルフィリン誘導体について鋭意研究を進めてきており、単一成分であり、安定的にかつ癌組織に対する良好な集積性を維持したまま、正常組織からの排出速度が速く、光毒性を軽減させたポルフィリン誘導体の提供を種々行ってきている。

そのなかで、チタンサファイアレーザー（670nm以上および600nm以下の波長）ならびに半導体レーザー（670nm）の使用が可能であるポルフィリン誘導体として次式（I）：



(式中、A s p はアスパラギン酸残基を表す)

で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体を提供してきている。

この式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理  
 5 学的に許容される塩のなかでも、特にナトリウム塩である化合物、すなわち A T  
 X - S 1 0 ・ N a と命名された化合物は、癌組織への集積性、ならびに新生血管  
 への選択的集積性が著しく高い化合物である。したがって、その優れた特性を利用  
 して、腫瘍および加齢性黄斑変性症の治療のための P D T 用治療剤として極めて  
 効果的なものであることを確認し、その点については既に特許出願を完了して  
 10 いる (W O 9 8 / 1 4 4 5 3 号公報)。

ところで、新生血管に起因する炎症を症状とする病気には様々なものがあり、  
 リューマチ、炎症性角化症もそのなかに位置する疾患である。

リューマチは、血管の炎症を症状の中心とする膠原病のなかの一つに分類され  
 ており、免疫の異常で起こる場合もあると言われているが、明確な原因が判って  
 15 いないため、的確な治療法が確立されていない。現在、リューマチの治療として  
 抗炎症剤、ステロイド、抗リューマチ製剤などの薬物による治療と、人工関節置  
 換などの手術による治療が行われているが、完治する確立は極めて低い。T r a  
 u n e r らは、P D T を応用したリューマチ治療について検討を行い、その点を  
 既に特許を出願している (アメリカ特許第 5, 3 6 8, 8 4 1 号) が、そこに開  
 20 示されている光感受性物質の選択的集積性が低いこと、および体内残留時間が長  
 いことから、この光感受性物質では光毒性が見られる危険性が高い。

また、炎症性角化症は、皮膚の真皮部分に存在する血管が広がり、リンパ球な

どの白血球が皮膚に侵入することによっておこる「炎症」と、皮膚の表皮が分厚くなって角層も分厚くなる「角化症」が同時に起こる皮膚症状である。その治療法としては、ステロイドなどの抗炎症剤、レチノイドなどの表皮増殖抑制剤、紫外線療法（P U V A療法）が実施されているが、完治に至る決定的な治療法ではない。

近年、5-アミノレブリン酸塩酸塩（5-A L A）を用いたP D Tによる治療が有効であることが判ってきている。しかしながら、5-A L Aはプロトポルフィリン I Xの生合成前駆体であり、プロトポルフィリン I Xの化合物特性、すなわち、新生血管集積性が低いこと、最長波長吸収端が630 nmである点などから、この5-A L Aでは十分な治療効果が得られていない。

本発明者らは、式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩の有する新生血管への高い選択的集積性に着目して、本化合物についてP D Tを応用した各種治療薬、あるいは診断薬としての用途についてさらに幅広い研究を進めてきた。その結果、ナトリウム塩である化合物、すなわちA T X-S 10・N aは、癌や眼科領域以外における新生血管に起因する炎症細胞への集積性も優れており、P D Tを応用した皮膚疾患治療薬として、炎症性角化症（乾癬などの皮膚炎）治療薬、あるいは膠原病のひとつである慢性関節リウマチに代表されるリウマチ治療薬として、極めて有効なものであることを新たに見いだした。

ところで、この式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩のなかでも、特にナトリウム塩である化合物、すなわちA T X-S 10・N aと命名された化合物は、適切な励起波長（400 nmなど）の光を照射すると670 nmの赤色蛍光を発することが判っており、腫瘍部の確定診断にも応用できることを既に開示している。

腫瘍を外科的に切除する手術を実施する場合、腫瘍部を的確に確定できれば必要以上に正常組織を切除することもなく、患者への負担が軽減するとともにQ O Lの向上にもつながる。

しかしながら、癌転移の危険性を考慮して、外科手術の後に化学療法を実施することも多いが、化学療法は、副作用の問題があるためできる限り実施しないのが理想である。

そこで最近、癌転移の有無を判定するため、腫瘍近傍のリンパ流を最初に受けるリンパ節としてのセンチネルリンパ節 (sentinel lymph node、以下SNと記す場合もある) を生検する方法が実施されている。すなわち、SNを生検した結果、SNに癌の転移がなければ、その周辺に存在するリンパ節の切除は不要であり、免疫低下等の後遺症を低減することができる。また、外科手術後の化学療法を実施する確率も低減されることとなる。

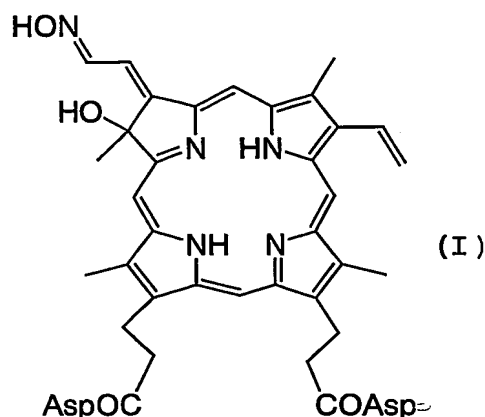
10 現在、SNを確定するためには、色素法とラジオアイソトープ法が実施されている。ところが、生体には脂肪組織が存在すること、リンパ管が細いことなどから、これらの方法でSNの位置を確定するには、かなりの熟練を要する。

本発明者らは、式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩が有する蛍光特性に着目し、SNの存在部位の確  
15 認ならびに癌転移の有無を診断し得る診断薬について研究を進めてきた。その結果、この化合物が極めて有効なSNの存在部位の確認、ならびに癌の転移の有無診断薬になり得ることを新規に見出し、本発明を完成させるに至った。

したがって、本発明は、PDT (Photodynamic Therapy : 光物理化学的診断・治療法) を使用した、リウマチ治療薬、炎症性角化症治療  
20 薬、ならびにセンチネルリンパ節 (SN) の存在部位確認、および癌転移診断薬を提供することを課題とする。

#### 発明の開示

本発明の基本的な態様は、次式 (I) :



(式中、Aspはアスパラギン酸残基を表す)

で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、脈管病に関する光物理化学的診断・治療法（PDT：Photodynamic Therapy）用のリウマチ治療薬、炎症性角化症治療薬であり、また、センチネルリンパ節（sentinel lymph node）の存在部位確認および癌転移診断薬である。

すなわち本発明の基本的態様は、上記式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩の、新生血管に対する集積性、あるいは腫瘍細胞に対する集積性を利用して、PDT療法を行う点に特徴を有するものである。

その新生血管に起因するひとつの病症としてリウマチ疾患がある。したがって本発明の第一の具体的態様は、上記式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を用い、PDTによる血管新生の阻害を行い、さらには滑膜細胞死により関節の破壊を抑制することによってリウマチを治療する方法であり、当該方法に使用する、上記式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とするPDTを用いたリウマチ治療薬である。

さらに、新生血管に起因する病症として、炎症性角化症がある。炎症性角化症とは角化症のなかでも炎症症状の著名なもの、すなわち潮紅と角化とが主体となった皮膚疾患である。そのなかでも、乾癬（psoriasis）あるいは類乾

癬 (parapsoriasis) があり、その治療はこれまでステロイド製剤等の強力な薬効を発揮する薬剤に頼らざるを得ない病症であった。しかしながら上記式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を経皮的に投与した場合に、皮膚の表皮下の炎症性細胞に効率よく集積するものであることを確認し、この集積された式 (I) の化合物にレーザー照射を行い、PDT療法を用いることにより、極めて有効に本疾患を治療し得るのである。

したがって、本発明の第二の具体的態様は、上記式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を用い、PDTによる皮膚表皮下の炎症性細胞の壊死を誘導し、効果的な炎症性角化症を治療する方法であり、当該方法に使用する上記式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とするPDTを用いた炎症性角化症（乾癬等の皮膚病）治療薬である。

ところで、センチネルリンパ節 (SN) とは、癌腫から最初にリンパ流を受けて、腫瘍の転移を受けるリンパ節である。したがって腫瘍のリンパ節転移はSN転移から始まるものであり、最近、SNに転移がなければ他のリンパ節にも転移は生じていないという概念 (sentinel node concept: SN concept) が採用されてきており、sentinel node navigation surgeryが行われつつある。

すなわち、センチネルリンパ節の存在部位を明らかにして、癌転移の有無の判定を行うことができれば、その症状における全リンパ節癌転移の有無の判定が可能となる。このSN conceptは、乳癌や悪性黒色腫では先に述べた色素法あるいはラジオアイソトープ法により、既に臨床応用されてきている。しかしながら、本発明者等は、ポルフィリン誘導体の蛍光特性を利用することにより、SNの存在部位の確認、および癌転移診断が高感度かつ安全になし得ることを見出した。

したがって、本発明の第三の具体的態様は、上記式 (I) で示されるイミノク

ロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、PDTを用いたセンチネルリンパ節（SN）の存在部位確認、および癌転移診断を行う方法であり、当該方法に使用する上記式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、

5 PDTを用いたSNの存在部位確認、および癌転移診断薬である。

本発明においては、上記式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩のなかでも、そのナトリウム塩である化合物（ATX-S10・Na）が特に効果的なものであることが判明した。したがって、本発明の最も具体的な態様は、式（I）で示されるイミノクロリンアスパ  
10 パラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩が、ナトリウム塩（ATX-S10・Na）であるPDTによるリユーマチの治療方法およびリユーマチ治療薬、炎症性角化症の治療方法および炎症性角化症治療薬、さらには、SNの存在部位確認および癌転移診断方法およびSNの存在部位確認および癌転移診断薬である。

15

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のATX-S10・Naを用いてPDTを実施したときのH  
UVEC生存率を図示したグラフである。

第2図は、PDT実施後のII型コラーゲン関節炎モデルマウス（コントロール  
20 群）におけるレーザー無照射の肉眼所見写真である。

第3図は、PDT実施後のII型コラーゲン関節炎モデルマウス（試験対象群）  
におけるレーザー照射後7日の肉眼所見写真である。

第4図は、PDT実施後のII型コラーゲン関節炎モデルマウス（コントロール  
群）における関節組織切片のレーザー無照射顕微鏡写真である。

25 第5図は、PDT実施後のII型コラーゲン関節炎モデルマウス（試験対象群）  
における関節組織切片のレーザー照射後の顕微鏡写真である。

第6図は、本発明のATX-S10・Naを用いてPDTを実施したときの角  
化培養細胞に対する殺細胞効果を示したグラフである。培養細胞に本発明のAT

X-S 10・Na を  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  添加し、同条件下で培養した後、リン酸緩衝液にて洗浄し、 $10 \text{ J}/\text{cm}^2$  でレーザー照射を行い、照射後 1, 2, 3, 6, 12 および 24 時間後の各時点における角化細胞の生存率をグラフに表した。

第 7 図は、皮膚炎モデルマウスに ATX-S 10・Na 含有浸水軟膏を塗布し  
5 3 時間経過後の蛍光画像である。(a) は ATX-S 10・Na 含有浸水軟膏を塗布したときの蛍光画像であり、(b) は ATX-S 10・Na を含有しない浸水軟膏を塗布したときの蛍光画像である。

第 8 図は、TPA 処理したマウスの皮膚に 1% ATX-S 10・Na (II) 浸水軟膏を塗布し、3 時間経過した皮膚炎モデルマウスにおける皮膚組織の断面顕  
10 微鏡写真である。(a) はレーザー照射後の写真であり、(b) はレーザー無照射の写真である。

第 9 図は、フォトリンを投与した場合の蛍光画像である。図中、上段左より 5 分後、10 分後。中段左より 15 分後、20 分後。下段左より 25 分後、30 分後の蛍光画像である。

15 第 10 図は、本発明の ATX-S 10・Na を投与した場合の蛍光画像である。図中、上段左より 5 分後、10 分後。中段左より 15 分後、20 分後。下段左より 25 分後、30 分後の蛍光画像である。

#### 発明を実施するための最良の形態

20 以下に、本発明について、実施例に代え各試験例により、それぞれ個々の発明の態様を詳細に説明する。

本発明で有効成分として使用される式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩は、例えば、WO 98/14453 号公報に記載の方法により製造することができる。薬理学的に許容される  
25 塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩等種々の塩が挙げられるが、そのなかでもナトリウム塩が好ましく、ナトリウム塩である式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体は、ATX-S 10・Na と命名された。



本発明が提供する第一の具体的態様は、式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩、特にそのナトリウム塩（ATX-S10・Na）を有効成分とするPDTによるリウマチの治療方法であり、またその治療に使用するリウマチ治療薬である。

- 5     リウマチのなかでも、難治性疾患とされている慢性関節リウマチは、病理学的には増殖性滑膜炎、滑膜下の肉牙腫様組織（パンヌス）形成、およびパンヌスによる軟骨、骨破壊を特徴として、臨床的には多関節の疼痛、腫脹、機能障害をきたし、患者のQOLを生涯にわたって著しく低下させる疾患である。したがって、慢性関節リウマチの治療目標は、増殖性滑膜炎（パンヌス）による関節
- 10   破壊を抑制することにある。そのために、リウマチ治療のひとつとしては、滑膜細胞による炎症を抑制させると共に、血管新生を阻害させ、関節破壊を抑制させればよい。

- そこで本発明者等は、II型コラーゲン関節炎モデルマウスを使用し、PDTを応用した血管新生阻害および滑膜細胞死誘導による関節破壊の抑制効果を、以
- 15   下の試験により検討した。

試験1（in vitro 試験）：臍帯血管内皮細胞（HUVEC）に対するPDT効果についての検討

- その第1段階として、ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）を使用し、炎症下
- 20   におけるPDTによるHUVECの細胞死の誘導を検討した。

- ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）を、培地を用いて、各well当たり $1.0 \times 10^4$  cells/wellで培養を行い、そこにIL-1 $\beta$ （1 ng/mL）およびTNF- $\alpha$ （10 ng/mL）を加えて刺激して、炎症状態とさせた。ついで、刺激1時間後に本発明のATX-S10・Naをそれぞれ25  $\mu$ g
- 25   /mLおよび50  $\mu$ g/mLを添加して、37℃にて24時間インキュベートした。

インキュベート後、培養細胞にレーザー照射（それぞれ0, 15, 30, 50 および100 J/cm<sup>2</sup> にて照射）し、レーザー照射後24時間目におけるHU

VECの生存率をMTTアッセイ法により測定した。

その結果、レーザー無照射のHUV ECでは細胞死は認められなかったが、レーザー照射を行ったいずれの群（15, 30, 50および100 J/cm<sup>2</sup> にて照射群）においても、HUV ECの生存率は約10～20%であった。生存率は、ATX-S10・Naの25 μg/mLおよび50 μg/mLの添加群の両者で同等であった（第1図）。

以上の試験結果から、ATX-S10・Naは、PDTを応用することにより、炎症下におけるHUV ECの細胞死を誘導していることが示唆された。

10 次に、実際のII型コラーゲン関節炎モデルマウスを使用し、PDTを応用した関節炎に対するATX-S10・Naの効果を以下の試験により検討した。

試験2（in vivo試験）：II型コラーゲン関節炎モデルマウスに対するPDT効果の検討

6～8週齢の雄性DBA/1マウス（体重15～18 g）を使用した。II型コラーゲン関節の誘導は、以下のとおりのスケジュールで行った。

試験開始日（0日）に、抗II型コラーゲン抗体カクテル2 mgを腹腔内注射し、1日目に同様抗II型コラーゲン抗体カクテル2 mgを腹腔内注射した。次いで、2日目および3日目にLPS（lipopolysaccharide）をそれぞれ50 μgずつ腹腔内注射し、II型コラーゲン関節炎を誘導させた。

20 試験開始後5日目に、II型コラーゲン関節炎が誘導されていることを確認して、試験対象群（一群5匹）として、ATX-S10・Naを5 mg/kgあたり静脈内注射し、投与後3時間目にレーザー照射（照射量：30 J/cm<sup>2</sup>）を行った。なお、コントロール群としてレーザー無照射群（一群3匹）を設けた。試験開始後14日目に、臨床的効果を臨床的関節スコア（Arthritis score：Terato等による、1995年）により評価すると共に、マウスを灌流固定して関節組織を採取し、Safranin O染色した脱灰組織標本について、組織学的に評価した。

その結果、レーザー無照射のコントロール群においては、関節炎の発症が継続

して見られ、その関節スコアは4であるのに対し（第2図）、レーザー照射を行った試験対象群では、関節炎の発症症状が認められず、関節スコアは0または1であった（第3図）。

5 また、組織学的な評価では、コントロール群は、滑膜細胞の著しい浸潤が認められたのに対し（第4図）、試験対象群は、滑膜細胞の浸潤が抑制されていた（第5図）。

以上の試験結果から、本発明のイミノクロリンアスラギン酸誘導体であるATX-S10・Naは、PDT療法により、リウマチ治療に極めて有効なものであることが判明した。

10 従来のポルフィリン誘導体は、選択的集積性が低く、正常組織からの代謝速度が遅いため、光線過敏症の副作用がみられ、遮光管理下での治療が必要とされるものである。一方、本発明のイミノクロリンアスラギン酸誘導体であるATX-S10・Naは、腫瘍ならびに炎症性細胞への選択的集積性が高く、正常組織からの代謝速度が速いため光線過敏症の副作用は著しく低減されている。また、組  
15 織深達度の高い長波長領域（670 nm）に吸収帯をもつ化合物であるため、外部からのレーザー照射による治療も可能である。

関節リウマチのなかでも特に難治性の内科的治療抵抗性滑膜炎の治療では、ステロイド剤の関節内注射、鏡視下での滑膜切除術、あるいは直視下滑膜切除術が行われているのが一般的である。ステロイド剤の場合は、関節内に反復投与で  
20 きないものもあり、また感染の危険性があり、かつ侵襲的である。また、鏡視下あるいは直視下での滑膜切除術は、入院管理の必要性があり、侵襲的で、ときにリハビリテーションも必要性となる。

これに対して本発明が提供するPDTを利用したリウマチの治療方法では、静脈内注射により、炎症部位の関節に光感受性物質を選択的に集積させ、関節局  
25 所に皮膚外部からレーザー照射することによって滑膜細胞の壊死を誘導し、関節破壊を抑制させるものであり、非侵襲的な、きわめて優れた治療方法である。

本発明が提供する第二の具体的態様は、式（I）で示されるイミノクロリンア

スパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩、特にそのナトリウム塩 (ATX-S10·Na) を有効成分とするPDTによる炎症性角化症 (乾癬等の皮膚病) の治療方法であり、またその治療に使用する炎症性角化症 (乾癬等の皮膚病) 治療薬である。

- 5 炎症性角化症は、角化症のなかでも炎症症状の顕著なもの、すなわち、潮紅と角化を主体とする症状である。その中に乾癬 (psoriasis) あるいは類乾癬 (parapsoriasis) があり、特異的な臨床像として、乾癬性紅皮症、関節症性乾癬、膿疱性乾癬等があげられる。

- 10 本発明者らは本発明が提供する式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩、特にATX-S10·Naが炎症性細胞に効率よく集積するものである性質を利用し、このATX-S10·Naを日本薬局方の親水軟膏基剤により親水軟膏を調製し、皮膚に塗布した。塗布後、皮膚を洗浄し、蛍光画像を撮像したところ、皮膚にATX-S10·Naが集積していることが確認された。

- 15 したがって、この段階でレーザー照射を行えば、PDT効果により炎症細胞の壊死を誘導し、効果的な炎症性角化症の治療を行うことができる。その点を以下の試験により確認した。

#### 試験3 (in vitro試験): 角化培養細胞に対する殺細胞効果の確認

- 20 炎症性角化症患者より角化細胞を採取し、37℃にて24時間培養を行った。培養細胞に本発明のATX-S10·Naを50 μg/mL添加し、同条件下で培養した後、リン酸緩衝液にて洗浄し、10 J/cm<sup>2</sup> でレーザー照射を行い、照射後の角化細胞の生存率を経時的に観察した。

- 25 レーザー照射前の培地上における細胞の生存状態を100%とし、照射後1, 2, 3, 6, 12および24時間後の各時点における細胞生存率を求めた。その結果を第6図に示した。ATX-S10·Naを添加して培養した後、レーザー照射することにより、角化細胞は6時間後に75%が死滅していた。

次に、皮膚炎モデルマウスを使用し、PDTを応用した皮膚炎に対するATX

—S 1 0・N aの効果を、以下の試験により検討した。

試験4 (i n v i v o試験) : マウス皮膚へのT P A (テトラデカノイルフォル  
ボールアセテート) 処理による皮膚炎の発症と、A T X—S 1 0・N a軟  
膏塗布後のP D Tによる治療効果の確認

5 1) A T X—S 1 0・N a軟膏の調製

日本薬局方に記載の親水軟膏基剤を用いて、製剤学上汎用される製剤技術により、A T X—S 1 0・N aを1 %および1 0 %含有する親水軟膏を調製した。

2) 炎症皮膚炎の発症

6～8週齢の雄性D B A／1 マウス（体重1 5～1 8 g）を使用し、バリカン  
10 および剃刀で剪毛した後、T P Aを塗布し、皮膚炎を発症させた。

3) 試験対象群として、皮膚炎を発症した皮膚の該当部位に、1 % A T X—S 1  
0・N a含有親水軟膏を塗布し、3時間後に洗浄を行った。なお、コントロール  
群としてA T X—S 1 0・N aを含有しない親水軟膏を塗布後、同様に洗浄を行  
った。塗布3時間後に、蛍光画像を撮像したところ、試験対象群においてのみ赤  
15 色蛍光が観察され、皮膚にA T X—S 1 0・N aが集積していることが確認され  
た（第7図）。

4) P D Tによるレーザー照射

次いで、試験対象群について、レーザー照射（照射：1 0 0 J／c m<sup>2</sup> および  
無照射）を行い、皮膚の状態を組織学的に観察した。

20 その結果、レーザーの無照射群では、T P Aに起因する皮膚疾患（炎症部位）  
が継続していたのに対して、レーザー照射群では、炎症部位の顕著な後退が認め  
られた。したがって、本発明のA T X—S 1 0・N aは、P D Tを応用すること  
により、皮膚炎症を有意に抑制することが確認された。

レーザー照射の有無による皮膚組織の断面顕微鏡写真を第8図として示した。

25 したがって、本発明の式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導  
体またはその薬理学的に許容される塩、特にA T X—S 1 0・N aは炎症性細胞  
に効率よく集積し、P D Tによるレーザー照射を行うことにより、炎症細胞の壊  
死を誘導し、効果的な炎症性角化症の治療効果をあげていることが判明した。

本発明の第三の具体的態様は、式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、PDTを用いたセンチネルリンパ節（SN）の存在部位の確認および癌の転移を診断する方法  
5    せあり、またそれに使用するSNの存在部位確認および癌転移診断薬である。

本発明者らは、本発明の式（I）で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩、特にATX-S10・Naの蛍光特性および腫瘍細胞への選択的集積性を利用した、そのセンチネルリンパ節の存在部位の確認、および癌転移の有無の検討を、以下の試験にしたがって行った。

10    試験5：マウス足節（foot pad）のセンチネルリンパ節の存在部位確認および癌転移の診断検討

6～8週齢の雄性DBA/1マウス（体重15～18g）を使用し、マウス足部にMeth-A癌細胞を移植した。癌細胞を移植後、試験検体としてATX-S10・Naの0.02mg/20 $\mu$ lを腫瘍部に注射投与し、投与後連続的に  
15    30分まで、マウス足節のセンチネルリンパ節の存在部位確認および癌転移の診断を、蛍光画像システムを用いて撮像した。

なお、ポルフィリン化合物としてフォトフリンを対照化合物として同様静脈投与し検討を行った。

蛍光画像システムによる撮影条件は以下のとおりである。

20    カメラ：カラーICCDカメラ

撮影方法：マイクロニコールf55mm（F2.8）

励起光カットF：Y52\*2

観察視野：39mm

励起光：光源ユニット（L7212）、レンズ（E5147-06）、ファイバ（A  
25    2873）

フィルター：XYZ\*2+B39+B37

投射距離：145mm

画像画像取り込み条件は以下のとおりである。

S-VHS->DV->DV Raptor (DV Video) 標準設定

画像サイズ: 640×480 Frame DV Format

(明るさ: 128; コントラスト: 199; 色濃度: 192; 色合い: 128;  
シャープネス: 1)

- 5 第9図は、対照化合物としてのフォトフリン (PFと略記する) を投与した場合の画像であり、第10図は、本発明のATX-S10・Na (S10と略記する) を投与した場合の画像である。

ATX-S10・Naの場合において、SNの存在部位が明瞭に観察された。

- 10 本SNを採取して試験管に入れ、0.3%トリクロロ酢酸/60%MeOH水溶液の500 $\mu$ Lを添加し、常温にて10分間超音波抽出した後、エッペンドルフチューブに移し、遠心分離 (8000g、10分間、4℃) した。上清液を200 $\mu$ L採取して、96穴平底プレート (Nalge Nunc 167008) に移し入れ、蛍光プレートリーダー (CytoFluor 2350、MILLIPORE) で蛍光強度を測定した。蛍光強度測定は、励起波長420nm、蛍光波長645nmにより実施した。SN内のATX-S10・Na濃度は10~20ng/mgであり、微量で検出できることが判った。

したがって、本発明の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体を利用することにより、SNの存在部位を明らかにして、それを生検することによって、癌転移の有無を判定することができる。

- 20 このセンチネルリンパ節への癌転移の有無を判定しうることは、全リンパ節癌転移の有無の判定が可能となるものであり、その後の診断、治療方針にひとつの方向性を与えることができる。

#### 産業上の利用可能性

- 25 以上記載のように、本発明は、式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体、その中でも特にそのナトリウム塩であるATX-S10・Naの腫瘍細胞あるいは炎症細胞に対する高い選択的な集積性を利用して、光物理化学的診断・治療法 (PDT: Photodynamic Therapy) による、リ

ユーマチ治療薬、炎症性角化症治療薬ならびにセンチネルリンパ節の存在部位確認および癌転移診断薬が提供される。

特に、リュウマチ治療薬に関しては、従来の関節リュウマチの治療が、手術のための入院の必要性和、侵襲的であるのに対し、本発明の治療薬は、手術を必要とするものではない点、さらに、疾患の直接の原因となる滑膜細胞を外部から細胞死させることにより関節破壊を抑制するものであり、その医療上の貢献度は多大なものである。

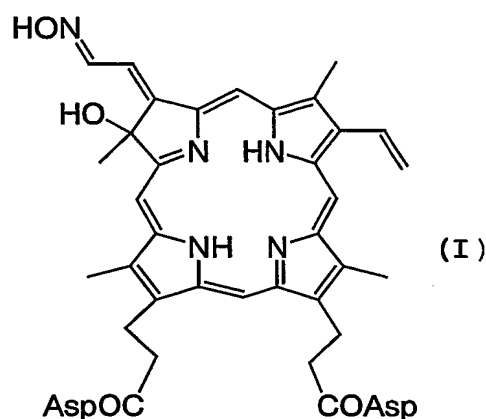
また、炎症性角化症治療薬に関しては、従来の抗炎症剤、表皮増殖抑制剤、紫外線療法（P U V A療法）は完治に至る決定的な治療法ではなく、5-アミノレ  
10 ブリン酸塩酸塩（5-A L A）を用いたP D Tによる治療は、5-A L Aの新生血管集積性が低いこと、最長波長吸収端が630nmである点などから、十分な治療効果が得られていなかった。それに対し、本発明治療薬を経皮的に投与した  
15 場合には、皮膚の表皮下の炎症性細胞に効率よく集積され、この集積された化合物にレーザー照射を行い、P D T療法を用いることにより、極めて有効に本疾患を治療し得るものである。

また、センチネルリンパ節の存在部位を確定し、癌転移を容易に判定しうることは、癌患者に対する治療方針を確実に実行できるものであり、その医療上の貢献度もまた極めて大きなものである。



## 請求の範囲

## 1. 次式 (I):



5 (式中、Aspはアスパラギン酸残基を表す)

で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を投与して、光物理化学的診断・治療法 (PDT: Photodynamic Therapy) を行うことによるリウマチを治療する方法。

10 2. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 請求の範囲第1項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とするPDT用のリウマチ治療薬。

15 4. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第3項に記載のリウマチ治療薬。

5. PDTによるリウマチ治療のための請求の範囲第1項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩の使用法。

20 6. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第5項に記載の使用法。

7. 請求の範囲第1項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン

酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を投与して、P D Tを行うことによる炎症性角化症を治療する方法。

8. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第 7 項に記載の方法。

5 9. 請求の範囲第 1 項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする P D T 用の炎症性角化症治療薬。

10 10. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第 9 項に記載の炎症性角化症治療薬。

11. P D T による炎症性角化症治療のための請求の範囲第 1 項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩の使用方法。

15 12. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第 1 1 項に記載の使用方法。

20 13. 請求の範囲第 1 項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を投与して P D T を行うことによるセンチネルリンパ節 (sentinel lymph node) の存在部位の確認および癌の転移診断する方法。

14. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第 1 3 項に記載の方法。

25 15. 請求の範囲第 1 項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする P D T 用のセンチネルリンパ節 (sentinel lymph node) の存在部位の確認および癌転移診断薬。

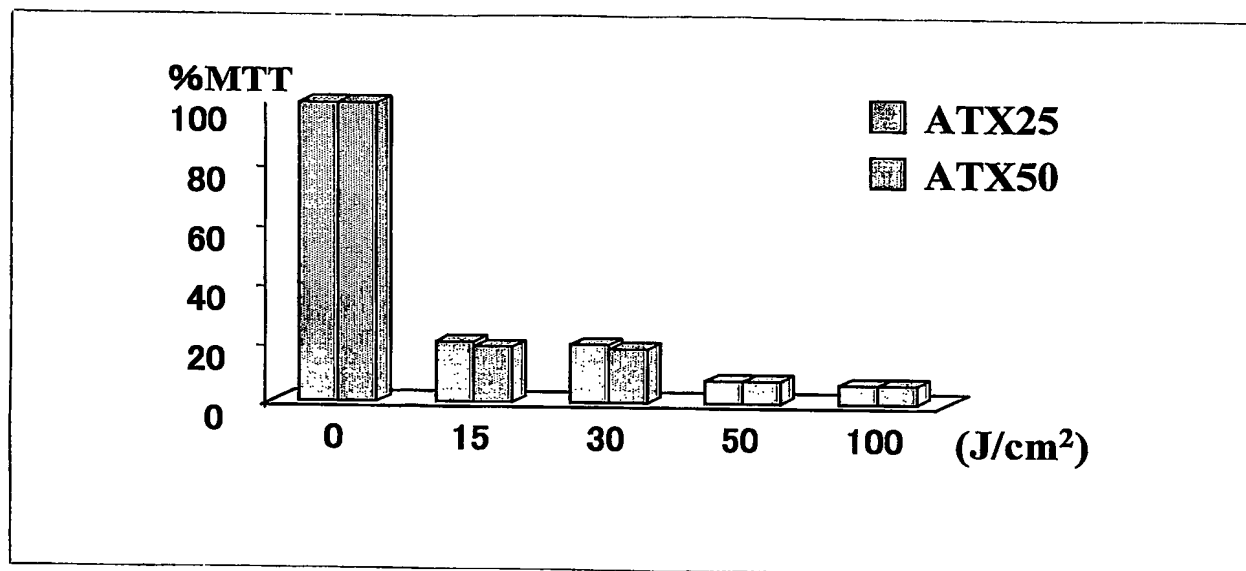
16. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第 1 5 項に記載のセンチ

ネルリンパ節 (sentinel lymph node) の存在部位の確認および癌転移診断薬。

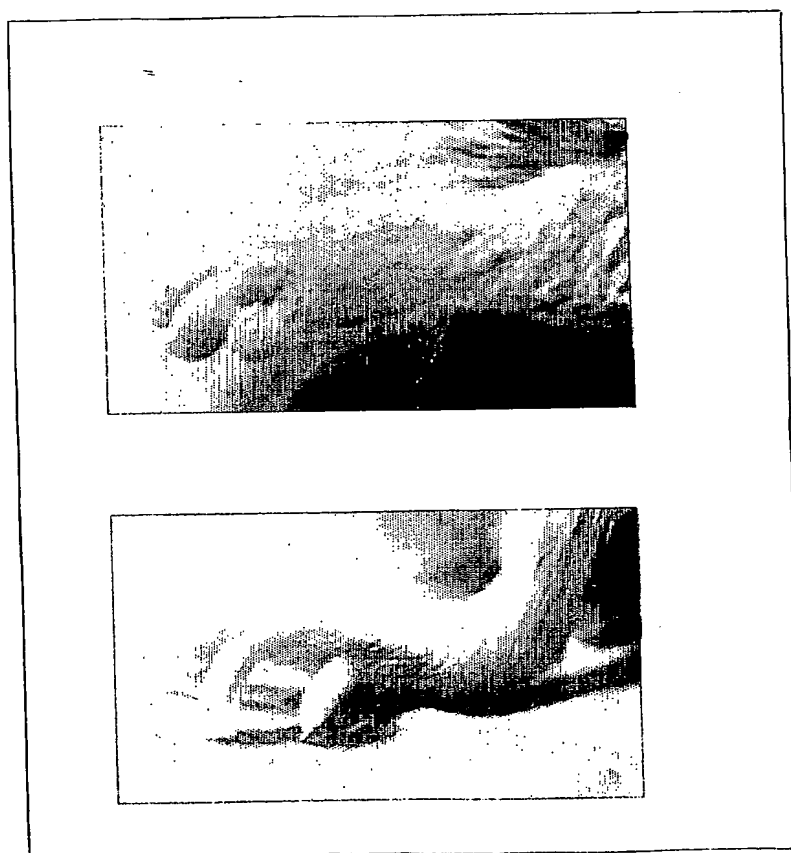
17. PDTによるセンチネルリンパ節 (sentinel lymph node) の存在部位の確認および癌の転移を診断するための請求の範囲第1項に記載の式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩の使用法。
18. 式 (I) で示されるイミノクロリンアスパラギン酸誘導体またはその薬理学的に許容される塩がナトリウム塩である請求の範囲第17項に記載の使用法。

1/6

第1図



第2図

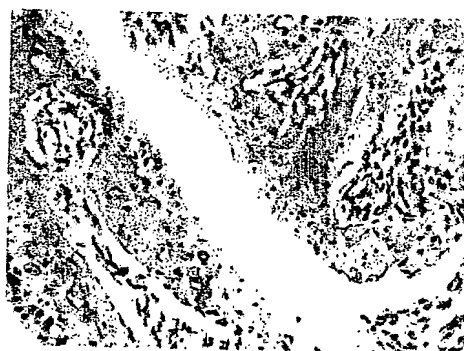


2/6

第3図

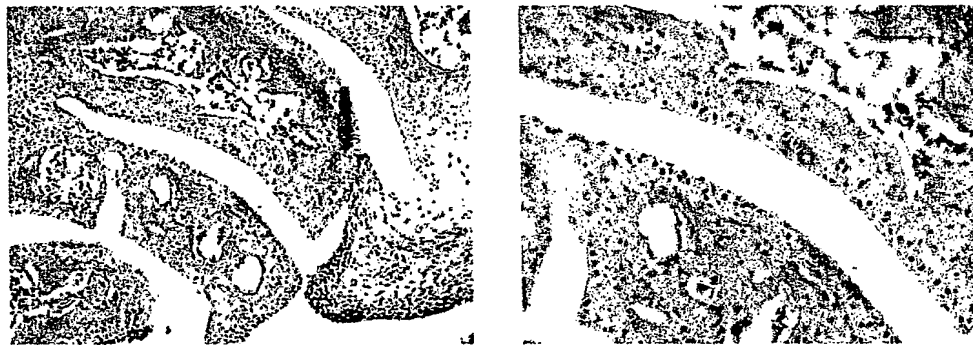


第4図

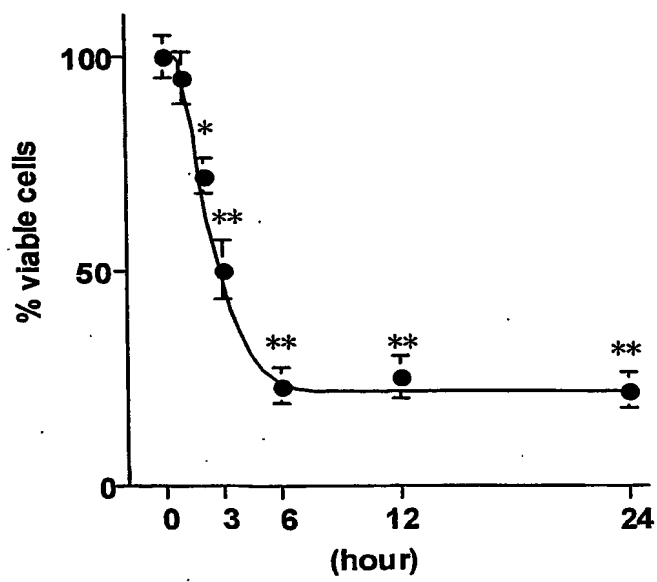


3/6

第5図



第6図



第7図

(a)



(b)

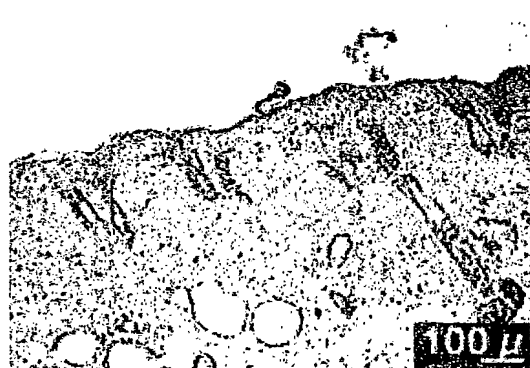


第8図

(a)



(b)



第9図





6/6

第10図



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/08016

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K31/409, 49/00, A61P17/00, 29/00, C07D487/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> A61K31/409, 49/00, A61P17/00, 29/00, C07D487/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 945454 A1 (LEDERLE (JAPAN), LTD.), 29 September, 1999 (29.09.99), Pages 3 to 4 & AU 9743229 A1 & WO 98/14453 A1 & KR 2000048843 A & US 6063777 A	15,16 3,4,9,10
X Y	Susumu NAKAJIMA, "Dai Ni Sedai no Photosensitizer ATX-S10Na (II) no Koshuyo Koka", Igaku no Ayumi, 1997 Nen, Vol.180, No.10, pages 689 to 690	15,16 3,4,9,10
Y	LEVY, J. G., "Photodynamic therapy", Trends Biotechnol., (1995) Vol.13, No.1, pages 14 to 18	3,4,9,10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
07 August, 2003 (07.08.03)

Date of mailing of the international search report  
19 August, 2003 (19.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No.

PCT/JP03/08016

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1, 2, 5-8, 11-14, 17, 18

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 1, 2, 5-8, 11-14, 17 and 18 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) (continued to extra sheet)

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1 to 6 relate to remedies for rheumatism containing the compound represented by the formula (I) as the active ingredient and a method of using the same, claims 7 to 12 relate to remedies for inflammatory keratosis containing the compound represented by the formula (I) as the active ingredient and a method of using the same, and claims 13 to 18 relate to diagnostics for cancer metastasis containing the compound represented by the formula (I) as the active ingredient and a method of using the same.

Although the matter common to claims 1 to 18 resides in being a drug containing the compound represented by the formula (I) as the active ingredient, it is not novel because of having been disclosed (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.I-1 of continuation of first sheet(1)

of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

in documents (EP 945454 A1, Susumu NAKAJIMA, Igaku no Ayumi, 1997 nen, Vol.180, No.10, pages 689 to 690 etc.). Therefore, this common matter falls within the category of prior art and thus cannot be regarded as a special technical feature.

Since there is no other common matter which is common to all claims and considered as a special technical feature, the present application has 3 groups of inventions.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/409, 49/00, A61P17/00, 29/00, C07D487/22

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> A61K31/409, 49/00, A61P17/00, 29/00, C07D487/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), CAOLD (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	EP 945454 A1 (LEDERLE (JAPAN), LTD.) 1999.09.29 第3-4頁 & AU 97432 29 A1 & WO 98/14453 A1 & KR 2000048843 A & US 6063777 A	15, 16 3, 4, 9, 10
X Y	中島進, "第二世代のフォトセンシタイザー-ATX-S10Na(II)の抗腫瘍効果", 医学のあゆみ, 1997年, Vol.180, No.10, pp.689-690	15, 16 3, 4, 9, 10
Y	LEVY, J. G., "Photodynamic therapy" Trends Biotechnol., (1995) V0 L.13, NO.1, pp.14-18	3, 4, 9, 10

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等而言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.03

国際調査報告の発送日

19.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

安藤 倫世



4 P

9837

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1, 2, 5-8, 11-14, 17, 18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲1, 2, 5-8, 11-14, 17, 18は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iV)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6は、式(I)で示される化合物を有効成分とするリユーマチ治療薬及びその使用方法に関するものであり、請求の範囲7-12は、式(I)で示される化合物を有効成分とする炎症性角化症治療薬及びその使用方法に関するものであり、請求の範囲13-18は、式(I)で示される化合物を有効成分とする癌転移診断薬及びその使用方法に関するものである。

請求の範囲1-18に共通の事項は、式(I)で示される化合物を有効成分とする医薬であるが、これは文献に開示されており (EP 945454 A1、中島進, 医学のあゆみ, 1997年, Vol. 180, No. 10, p. 689-690等参照)、新規ではないから、この共通事項は先行技術の域を出ず、特別な技術的特徴であるとは認められない。

また、請求の範囲全てに共通の事項であって、特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、本出願に含まれる発明の数は3である。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**